

不同品种菊花组织培养比较研究

丁世民¹, 王泽宇², 宋健云³, 朱明辉⁴, 郝会军¹

(1. 潍坊职业学院 园林工程系, 山东 潍坊 261031; 2. 山东农业大学, 山东 泰安 271000; 3. 诸城市园林处, 山东 诸城 262200; 4. 海阳市园林处, 山东 海阳 265100)

摘 要:以“大地红”、“金丝菊”、“红线金钩”、“天王山”、“风清月白”、“东海月”、“富士丽花”、“北京红”、“彩霞万缕”、“金龙盘红”、“光辉”、“金钩挂月”、“星火”、“墨荷”、“美国粉”、“绿牡丹”、“满江红”、“红世界”、“清水岸”、“绿朝云”20 个菊花品种为试材,以菊花的花蕾作为外植体,在相同的培养条件下,对不同菊花品种愈伤组织的诱导、丛生芽的诱导及生根状况进行研究。结果表明:不同的菊花品种无菌繁殖系的建立、愈伤组织的诱导、芽的诱导以及生根状况都存在着较大的差异。

关键词:菊花;花蕾;组织培养
中图分类号:S 682. 1⁺1 文献标识码:A 文章编号:1001—0009(2011)23—0101—03

菊花为菊科菊属多年生宿根花卉,原产我国,是世界四大切花之一。近年来,随着世界花卉业的发展和人们物质生活水平的提高,通过传统的扦插、嫁接等繁殖方法已不能满足人们的需要,而组织培养方法不仅繁殖系数高、繁殖速度快,而且还可以进行品种的脱毒复壮、种质资源保存等。菊花的花蕾发育程度较高,由它经组织培养形成的幼苗,能够较好的保持原品种的优良特性。该试验通过对不同品种菊花花蕾的组织培养,研究不同品种菊花在相同培养条件下的差异性。

第一作者简介:丁世民(1964-),男,山东安丘人,硕士,教授,主要研究方向为园林植物病虫害防治与生物技术。E-mail:dingshimin@126.com。
收稿日期:2011—09—08

1 材料与方法

1.1 试验材料
试验用菊花取自潍坊职业学院菊花品种资源圃,选取菊花花蕾作为试验外植体,不同品种菊花名称及代码见表 1。

表 1 不同品种菊花名称及代码			
品种名	代码	品种名	代码
“大地红”	A	“光辉”	K
“金丝菊”	B	“金钩挂月”	L
“红线金钩”	C	“星火”	M
“天王山”	D	“墨荷”	N
“风清月白”	E	“美国粉”	O
“东海月”	F	“绿牡丹”	P
“富士丽花”	G	“满江红”	Q
“北京红”	H	“红世界”	R
“彩霞万缕”	I	“清水岸”	S
“金龙盘红”	J	“绿朝云”	T

Study on the Transforming Chitinase and β-1,3-glucanase to Pepper Via *Agrobacterium tumefaciens*

XIE Li-bo, GUO Ya-hua, WANG Xue, GAO Yong-li, ZHOU Yu
(Horticultural Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: *In vitro* plant of pepper at about 7~10 d were used as material of infection for transformation of fungi resistant genes Chitinase and β-1,3-glucanase via *Agrobacterium tumefaciens* to study the impact from genotype, explant type and concentration of antibiotic on genetic transformation of pepper, in order to obtain resistant plant through gene modification. The results showed that significant difference appeared in the transformation with various genotypes, explants types, varieties of antibiotics and the concentration. Three resistant pepper plants were gained after transformation of genes of chitinase and β-1,3-glucanase via *agrobacterium tumefaciens*.

Key words: chitinase; β-1,3-glucanase; pepper; transformation

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择与处理 菊花能产生的再生器官很多,如菊花的茎尖、茎段、侧芽、花瓣、叶片等,该试验以未开放的花蕾作为外植体。选取生长健壮无病虫害的菊花植株,采取其上未开放的花蕾,这时花瓣外有1层薄膜包着,内部是无菌的。每一品种取生长状况一致的10个花蕾,于流水中冲洗,洗去表面的泥土和杂质,然后放入无菌容器中,以待灭菌。

1.2.2 外植体的灭菌 将清洗干净的花蕾在75%的酒精中浸泡30 s进行表面灭菌,然后用0.1%的升汞溶液灭菌7 min,灭菌完毕后用无菌水冲洗3~4次,最后接种于诱导培养基上,观察灭菌时间对不同品种菊花建立无菌体系的影响。

1.2.3 外植体的培养 该试验采用MS为基本培养基,在MS培养基的基础上添加不同种类和浓度的激素可进行芽体的诱导、增殖及生根培养。其中诱导培养基为:MS+BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L+3%糖+6.5%琼脂;增殖培养基为:MS+3%糖+6.5%琼脂;生根培养基为:1/2MS+NAA 0.1 mg/L+2%糖+6.5%琼脂。pH为5.8~6.0,灭菌条件为121℃、30 min。培养温度:24~26℃;光照时间:12 h/d为宜,在愈伤组织诱导期进行适量的暗培养有促进愈伤形成的作用;光照强度:1 500~3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对不同品种菊花花蕾无菌体系建立的影响

将菊花花蕾经75%的酒精处理30 s,0.1%的升汞灭菌7 min后接种于诱导培养基上,考虑到操作过程中可能由于操作不当被空气中的细菌污染,因此为了减少污染率,每瓶培养基上只接种1个外植体,每个品种接种10个。接种完毕后放置于培养室中培养,7 d后观察统计,结果见表2。由表2可知,在相同的灭菌时间条件下,不同菊花品种其成活率是不相同的,耐药性也不相同。根据观察可知,大多数外植体死亡的原因是由于灭菌时间过长破坏了植物细胞的组织成分,致使外植体未产生分化,少部分由于操作动作和消毒工作处理不当致使外植体被感染而死亡。

2.2 菊花花蕾愈伤组织的诱导及生长状况

菊花花蕾需经过15~20 d的培养形成愈伤组织,为了使不同品种之间具有可比性,对于那些成活率低的品种又重新进行接种,最后以8为基数进行比较,研究其诱导率,不同品种愈伤组织的诱导状况不同,由表3可知,菊花品种A和N的诱导率最高达100%,菊花品种L和P的诱导率最低37.5%,一般诱导率都在60%~90%,愈伤组织质地紧密,生长良好。愈伤组织的颜色和形状详见表3。

2.3 不同菊花品种丛生芽的诱导情况

由花蕾外植体培养形成的愈伤组织再经过20~

表2 灭菌时间对不同菊花无菌体系建立的影响

品种	75%酒精/s	0.1%升汞/min	接种数/个	成活数/个	成活率/%
A	30	7	10	10	100
B	30	7	10	6	60
C	30	7	10	4	40
D	30	7	10	5	50
E	30	7	10	7	70
F	30	7	10	3	30
G	30	7	10	3	30
H	30	7	10	7	70
I	30	7	10	4	40
J	30	7	10	8	80
K	30	7	10	4	40
L	30	7	10	5	50
M	30	7	10	5	50
N	30	7	10	4	40
O	30	7	10	3	30
P	30	7	10	3	30
Q	30	7	10	7	70
R	30	7	10	6	60
S	30	7	10	5	50
T	30	7	10	4	40

表3 愈伤组织的诱导及生长状况

品种	接种数/个	诱导数/个	诱导率/%	愈伤组织的颜色和形状
A	8	8	100	嫩绿色、米粒状、质地紧密
B	8	7	87.5	淡黄色、米粒状、质地紧密
C	8	6	75.0	米黄色、粒状、质地松散
D	8	4	50.0	米黄色、米粒状、质地松散
E	8	7	87.5	淡绿色、粒状、质地紧密
F	8	6	75.0	淡黄色、米粒状、质地紧密
G	8	6	75.0	绿色、粒状、质地紧密
H	8	7	87.5	淡绿色、米粒状、质地紧密
I	8	6	75.0	米黄色、粒状、质地紧密
J	8	6	75.0	淡黄色、粒状、质地紧密
K	8	4	50.0	白色、水渍状、质地松散
L	8	3	37.5	白色、水渍状、质地松散
M	8	7	87.5	淡绿色、米粒状、质地紧密
N	8	8	100	绿色、米粒状、质地紧密
O	8	5	62.5	米黄色、粒状、质地紧密
P	8	3	37.5	白色、水渍状、质地紧密
Q	8	6	75.0	淡黄色、米粒状、质地紧密
R	8	7	87.5	绿色、米粒状、质地紧密
S	8	6	75.0	米黄色、米粒状、质地紧密
T	8	6	75.0	淡绿色、米粒状、质地紧密

30 d的培养会分化出较多的丛生芽,为了便于比较,每个品种取8瓶的平均丛生芽数,发现不同品种之间形成丛生芽存在着差异性,苗的生长状况也不尽相同。由表4可知,A形成的平均丛生芽数最多,即繁殖系数最高,L和P的繁殖系数较低,可见绿色或淡黄色米粒状的愈伤组织容易出芽,而白色、水渍状,质地松散的愈伤组织难以出芽。大部分品种的繁殖系数都在3~5。在相同的培养条件下芽的生长状况见表4。

2.4 继代培养扩繁

将丛生芽切割下,进行切断繁殖,接种于增殖培养基上,一般15 d后可长出丛生芽,取出丛生芽转接于新的培养基上,则可在更短的时间内(约10 d)长出丛生芽,据观察可知,继代的次数越多,从接种到长出丛生芽的时间越短,但不短于7 d。若不及时转接,芽苗会迅速长高,不同菊花品种之间没有显著差异。

表 4 不同菊花品种丛生芽的诱导情况

品种	平均丛生芽数/个·瓶 ⁻¹	芽的生长状况
A	8.0	健壮
B	7.2	健壮
C	4.0	苗细长,生长势弱
D	4.0	健壮
E	5.0	健壮
F	3.5	呈现老化,生长慢
G	4.2	苗粗壮,生长势强
H	4.5	健壮
I	5.0	健壮
J	6.0	健壮
K	3.8	呈现老化,生长缓慢
L	2.5	苗细长,生长较弱
M	5.0	健壮
N	4.3	苗粗壮,生长势强
O	5.0	健壮
P	2.0	苗细长,基部愈伤组织多
Q	4.0	苗粗壮
R	4.0	呈现老化,生长慢
S	7.0	健壮
T	5.0	健壮

2.5 不同菊花品种诱导生根状况的比较

当增殖试管苗长到 2~3 cm 的时候,选取健壮的无根小苗切割后转移到生根培养基上,经大约 1 周的培养,小苗开始生根。由表 5 可知,随着时间的延长生根率明显提高,大多数品种在第 7 天的生根率达 50% 以上,到第 12 天时生根率达 80% 以上,个别品种在第 12 天的生根率达 100%。L 的生根率最低,针对这种情况又重新作了研究,将其中未生根的 L 接种于 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 上,结果发现 L 在第 7 天的生根率达 75%,这恰好与有关资料报道的有些菊花对 MS+IBA 的诱导效果好于 MS+NAA 的诱导效果相符合^[6]。

3 结论与讨论

该试验选择了菊花花蕾作为外植体,内部是无菌的,克服选取芽、茎、叶作为外植体消毒时易产生褐变的状况。结果表明,在相同的培养条件下,不同菊花品种无菌繁殖系的建立、愈伤组织的诱导、芽的诱导以及生根状况都存在着差异。但在此种培养条件下,花蕾经过 15~20 d 的培养诱导率达 60%~90%,愈伤组织

再经过 20~30 d 的培养平均形成的丛生芽为 3~5 个,大多数进行生根培养 7 d 后生根率达 50%,第 12 天后生根率达 80%。另外菊花离体快繁研究中还存在着一些问题,如优良品种生根困难、不同品种和不同部位诱导培养基的差别、培养过程中内生菌和褐变现象的控制等,以及其它菊花品种在此种培养基上能否达到上述效果还有待于进一步研究。

表 5 7 d 后不同品种菊花小苗的根诱导情况

品种	培养时间/d	接种苗数/个	生根苗数/个	生根率/%	根长/cm	生根数/条
A	7	30	18	60.0	0.2~0.5	2~5
B	7	30	15	50.0	0.1~0.5	3~7
C	7	30	15	50.0	0.2~0.5	2~4
D	7	30	17	56.7	0.2~0.8	3~5
E	7	30	18	60.0	0.2~0.6	2~5
F	7	30	17	56.7	0.2~0.6	2~5
G	7	30	18	60.0	0.2~0.5	2~4
H	7	30	15	50.0	0.1~0.5	1~3
I	7	30	14	46.7	0.1~0.6	1~4
J	7	30	17	56.7	0.2~0.6	2~3
K	7	30	16	53.3	0.3~0.7	2~5
L	7	30	12	40.0	0.1~0.4	1~3
M	7	30	14	46.7	0.2~0.5	2~4
N	7	30	15	50.0	0.2~0.8	2~5
O	7	30	18	60.0	0.1~0.6	2~5
P	7	30	20	66.7	0.1~0.3	1~2
Q	7	30	18	60.0	0.2~0.5	2~4
R	7	30	24	80.0	0.2~0.6	2~5
S	7	30	18	60.0	0.1~0.5	2~3
T	7	30	15	50.0	0.2~0.5	2~4

参考文献

[1] 李英,刘德祥,李长恭,等.菊花花蕾的组织培养[J].河南职业技术学院学报,1992,20(4):59-60.
[2] 戚贤军.利用菊花花蕾诱导胚状体发生的快繁体系研究[J].浙江林业科技,2003,23(4):12-14.
[3] 侯玉杰,朱涛,王晓涛.菊花的组织培养研究[J].信阳师范学院学报,2005,18(3):323-325.
[4] 刘鹏,刘金,赵红艳,等.菊花的组织培养、脱毒与快繁技术研究[J].内蒙古民族大学学报,2005,20(4):410-413.
[5] 向萍,刘超权,陶保保.菊花的组织培养和快速繁殖[J].黄冈师范学院学报,1999,19(4):79-80.
[6] 梁称福,易诚,范适,等.菊花组培快繁技术研究[J].湖南环境生物职业技术学院学报,2006,12(3):242~244.

Comparison Study on the Tissue Culture of Different Varieties of Chrysanthemum

DING Shi-min¹, WANG Ze-yu², SONG Jian-yun³, ZHU Ming-hui⁴, HAO Hui-jun¹

(1. Department of Landscape Engineering, Weifang Vocational College, Weifang, Shandong 261031; 2. Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000; 3. Zhucheng Landscape Bureau, Zhucheng, Shandong 262200; 4. Haiyang Landscape Bureau, Haiyang, Shandong 265100)

Abstract: Taking ‘Dadihong’, ‘Jinsiju’, ‘Hongxianjingou’, ‘Tianwangshan’, ‘Fengqingyuebai’, ‘Donghaiyue’, ‘Fushilihua’, ‘Beijinghong’, ‘Caixiawanlu’, ‘Jinlongpanhong’, ‘Guanghui’, ‘Jingouguayue’, ‘Xinghuo’, ‘Mohe’, ‘Meiguofen’, ‘Lv mudan’, ‘Manjianghong’, ‘Hongshijie’, ‘Qingshuian’, ‘Lvzhaoyun’ 20 kinds of chrysanthemum variety as test material, using the chrysanthemum flower buds as explants in the same culture conditions, callus induction, induction of buds and rooting conditions of 10 chrysanthemum variety were studied. The results showed that there were big differences among different varieties of chrysanthemum on the system establishment of the sterile breed, callus induction, the induction of buds and rooting conditions.

Key words: chrysanthemum; flower buds; tissue culture